3 月 March
2019, 62(3): 294 – 303

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http: //www. insect. org. cn
doi: 10. 16380/j. kcxb. 2019. 03. 003

棉铃虫酪氨酸羟化酶基因的分子特性及功能分析

姚 雪, 李琳红, 魏纪珍, 席玉强, 杜孟芳, 崔江宽, 安世恒, 刘晓光*

(河南农业大学植物保护学院, 省部共建小麦玉米作物学国家重点实验室, 郑州 450002)

摘要:【目的】酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)是黑色素形成的关键酶,在昆虫表皮骨化过程中扮演重要角色。本研究旨在获得棉铃虫 *Helicoverpa armigera* TH 基因序列,并研究其分子特性、表达模式和功能,为更深入探析该基因作用机理奠定基础。【方法】通过生物信息学和分子生物学技术获得了棉铃虫 TH 基因序列,利用 qRT-PCR 分析该基因在棉铃虫不同生长发育阶段的表达模式;利用 qRT-PCR 技术,分别测定了蜕皮激素 20E(400 ng/头)处理不同时间和 RNAi 成功干扰蜕皮激素受体基因(*EcR*)前提下再用 20E(400 ng/头)处理后,棉铃虫 5 龄幼虫 *TH* 表达量变化;采用生物化学方法检测鞣化激素(30 μg/mg 组织)和环腺苷酸(cAMP, 200 ng/mg 组织)处理后棉铃虫幼虫脂肪体中 TH 活性。【结果】获得了棉铃虫酪氨酸羟化酶基因 *TH* (GenBank 登录号: MF440319) cDNA 片段,长 2 270 bp,开放阅读框 1 686 bp,编码 561 个氨基酸残基。该基因在棉铃虫整个发育期均表达,其中在卵期第 3 天、2 龄幼虫第 1 天、3 – 5 龄蜕皮期、预蛹期和成虫羽化第 1 天表达量相对较高。研究还发现,400 ng/头 20E 注射能够促进 *TH* 的转录;在成功干扰并调低幼虫 *EcR* 转录水平的前提条件下(对照仅注射 ds*GFP*)再注射 20E,对 *TH* 表达量无明显影响;而鞣化激素(30 μg/mg 组织)和 cAMP(200 ng/mg 组织)均显著提高了 TH 的酶活性。【结论】20E 在转录水平参与了 *TH* 的表达;鞣化激素和 cAMP 均能够提高 TH 活性,在蛋白水平上对 TH 进行调控。

关键词: 棉铃虫; 酪氨酸羟化酶; RNA 干扰; 蜕皮激素; 鞣化激素

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2019)03-0294-10

Molecular characterization and functional analysis of tyrosine hydroxylase gene in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

YAO Xue, LI Lin-Hong, WEI Ji-Zhen, XI Yu-Qiang, DU Meng-Fang, CUI Jiang-Kuan, AN Shi-Heng, LIU Xiao-Guang* (State Key Laboratory of Wheat and Maize Crop Science, College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract:【Aim】Tyrosine hydroxylase (TH) is a key enzyme of melanin biosynthesis and plays an important role in epidermal sclerotization. This study aims to obtain the cDNA sequence of TH gene of *Helicoverpa armigera*, and to analyze its molecular characteristics, expression pattern and function, so as to provide a foundation for further exploring its action mechanism.【Methods】The full-length cDNA sequence of TH gene was cloned from *H. armigera* by using bioinformatics and molecular cloning technique. The developmental expression pattern of this gene was assayed with qRT-PCR. The expression of TH gene in the 5th instar larva of *H. armigera* after treatment with 20E (20-hydroxyecdysone) (400 ng/individual) for different time and RNAi of ecdysone receptor gene (*EcR*) followed by 20E treatment (400 ng/individual) was analyzed by qRT-PCR, respectively. The TH acitivity in the fat body of *H. armigera* larvae after treatment with bio-stimulants bursicon (30 μg/mg tissue) and cAMP (200 ng/mg

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0200600, 2018YFD0200606); 广西农业环境与农产品安全重点实验室培育项目(AA17204043)
作者简介: 姚雪, 女, 1993 年 1 月生, 河南郑州人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生理与分子生物学, E-mail: yaoxue983@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xgliu2000@aliyun.com
收稿日期 Received: 2018-08-31; 接受日期 Accepted: 2018-11-15

tissue) was determined by biochemical method. 【Results】We cloned the full-length cDNA sequence of *TH* (GenBank accession no.: MF440319) from *H. armigera*, which is 2 270 bp in length with a 1 686 bp open reading frame encoding 561 amino acids. *TH* is ubiquitously expressed in all the examined developmental stages of *H. armigera* and relatively highly expressed in day-3 of egg stage, day-1 of the 2nd instar larval stage, 3rd – 5th instar molting stages, prepupal stage and 1 day-old adult. *In vitro* treatment, the steroid hormone 20E (400 ng/individual) significantly up-regulated the transcription level of *TH*, but the 20E treatment after RNAi-mediated knockdown of 20E receptor gene *EcR* showed no obvious effect on the transcription of *TH* as compared with the control (injected with ds*GFP* only). Enzymatic activity assay demonstrated that both bursicon (30 μg/mg tissue) and cAMP (200 ng/mg tissue) led to significant increase of the TH activity. 【Conclusion】20E is involved in the regulation of *TH* expression at the transcriptional level, and both bursicon and cAMP can promote the TH activity at the protein level.

Key words: *Helicoverpa armigera*; tyrosine hydroxylase; RNAi; 20-Hydroxyecdysone; bursicon

与其他节肢动物类似，昆虫外骨骼由单层皮细胞分泌物硬化、内陷形成(Kramer *et al*., 1991; Arakane *et al*., 2016)。硬化的外骨骼既能保护虫体、抵御环境中病原微生物入侵，又可防止体表水分蒸发。然而，这种特殊的体壁构造也限制了虫体的生长。为了生长，昆虫必须周期性地蜕去旧表皮、形成新表皮，最终完成向成虫的转变(Arakane *et al*., 2016)。若虫(蛹)羽化时，蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)滴度的下降是引发蜕皮的第一步(Curtis *et al*., 1984)，此后鞣化激素(bursicon)等众多小分子活性神经肽协同作用，调控羽化过程(Davis *et al*., 2007)。成虫羽化后，新表皮或翅的延展在几分钟内便迅速完成，而表皮的鞣化也仅发生在数小时内(Reynolds *et al*., 1979)。因此，根据昆虫蜕皮(羽化)后表皮(翅)鞣化程度，可以准确判断其发育时期。

鞣化激素是一类异源二聚体神经肽，由 α 和 β 亚基组成(Luo *et al*., 2005; Mendive *et al*., 2005)。该激素与富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体(Rickets)特异结合后可激活环腺苷/蛋白激酶 A (cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, cAMP/PKA)信号通路，PKA 进一步激活下游关键基因促进黑色素的形成(An *et al*., 2008; Song, 2012)。在黑色素代谢通路中，有一种酶起着分子开关作用，即酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)，它也是整个代谢途径的限速酶。研究发现 PKA 可以通过磷酸化激活 TH，从而实现对黑色素生物合成的调控(Baker and Truman, 2002; Luo *et al*., 2005; Mendive *et al*., 2005; Davis *et al*., 2007; Gervasi *et al*., 2016)。TH 广泛存在于昆虫中，其主要生化过程是通过羟基化反应，将左旋酪氨酸(L-酪氨酸)催化为二羟基苯丙氨酸(levodopa, L-DOPA)，也称多巴(Nagatsu *et al*., 1964)。L-DOPA 在多巴脱羧酶(dopa decarboxylase, DDC)的作用下转化成多巴胺(dopamin)，多巴胺及其他途径形成的共同衍生物 N-乙酰多巴胺(N-acetyl dopamine)和 N-β-丙氨酰多巴胺(N-β-alanyldopamine)在多酚氧化酶的作用下形成黑色素，参与昆虫表皮的形成过程(Wright, 1987; Gorman and Arakane, 2010; Andersen, 2012)。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 是棉花、玉米和花生上重要害虫，随着国内种植结构的调整，棉铃虫引起的灾变风险有逐年增加的趋势(陆宴辉等, 2018)。而影响棉铃虫幼虫生长发育的一些重要基因仍有待挖掘，如 TH 基因在棉铃虫中尚未报道。因此，我们将棉铃虫作为实验材料，详细研究该基因的分子特性。利用分子生物学与生物信息学技术，以期获取棉铃虫 *TH* 序列。利用 RNA 干扰(RNAi)技术，研究 20E 是否参与 *TH* 的转录，并且分析鞣化激素对 TH 活性的影响，明确 *TH* 相关基因的分子特性和功能，为进一步探索激素引起的昆虫代谢通路和了解其中相关基因的分子调控机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及主要试剂

棉铃虫为室内人工饲养，饲养条件：温度 26 ± 1℃，相对湿度 65%，光周期 16L∶8D。大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 为本实验室保存。棉铃虫鞣化激素 α 和 β 亚基形成的鞣化激素异源二聚体(Bursicon α + β)重组蛋白为本实验室表达。总 RNA 抽提试剂(Trizol Reagent)购自 Invertrigen 公

司；RACE 试剂盒购自 Clonetech 公司；体外转录试剂盒购自 ABI 公司；2 × *Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶（*Eco*R Ⅰ、*Han*d Ⅲ 等）、pMD18-T 载体、DNA Marker、荧光定量试剂盒（SYBR Primer Script RT-PCR Kit）、反转录试剂盒（Prime Script™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit）购自宝日医生物技术（北京）有限公司；DNA 凝胶回收试剂盒、产物纯化试剂盒和质粒提取试剂盒、IPTG（异丙基-β-D-硫代半乳糖苷）以及 X-gal（5-溴-4-氯-3-吲哚-D-半乳糖苷）为生工生物工程（上海）股份有限公司产品，酪氨酸羟化酶检测试剂盒为上海杰美基因有限公司产品，本研究使用的其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 酪氨酸羟化酶基因的获得及同源序列的分析

以实验室前期获得的棉铃虫转录组 unigene 建立本地数据库（数据未发表），利用家蚕酪氨酸羟化酶氨基酸序列（GenBank 登录号：NP_001138794.1）作为诱饵蛋白进行 tBlastn 搜索，钓取棉铃虫候选蛋白，获得棉铃虫该基因 cDNA 序列，同时与棉铃虫基因组数据库比对；搜集其他已知昆虫酪氨酸羟化酶氨基酸序列进行比对分析。此外，根据搜集到的酪氨酸羟化酶基因的氨基酸序列，在 MEGA 7（7.0.14）软件中，选择 Jones-Taylor-Thornton（JTT）模型，利用最大似然法（maximum likelihood method）构建系统进化树进行聚类分析。

1.3 棉铃虫 TH 基因在不同发育时期的表达

根据 1.2 节获得的棉铃虫酪氨酸羟化酶基因序列设计特异性引物，同时设计棉铃虫内参引物及对照引物（表 1），引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。不同时期棉铃虫组织样品的收集与处理按照下列步骤。首先，棉铃虫卵（卵期 1 – 3 d）、幼虫（包含蜕皮期）、蛹（包含预蛹期）与成虫，卵期取整个卵（50 粒为一批次），幼虫、蛹与成虫分别整体取样（每 10 头幼虫或成虫为一组，先用液氮在研钵里充分研磨，取适量样品分别放入含有 400 ~ 900 μL 不等 Trizol Reagent 的 PE 管中），提取得到总 RNA，取 1 μL 用 NanoDrop™ 检测，记录其浓度和 RNA 质量，保证 OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.8 ~ 2.0 之间。获得的各样品总 RNA 按照反转录试剂盒操作步骤合成 cDNA：gDNA Eraser Buffer 2 μL，1 μL gDNA Eraser，1 μg 不同样品的总 RNA，6 μL RNase free dH_2O，配制成 10 μL 体系，42℃ 反应 2 min，冰上加入 5 × PrimeScript® Buffer 2 μL，PrimeScript® RT Enzyme Mix Ⅰ 1 μL，RT Primer Mix 1 μL，RNase-free dH_2O 4 μL。混合均匀后在 37℃ 反应 15 min，然后 85℃ 反应 5 s，样品 –80℃ 保存以备合成双链 RNA 和 qRT-PCR 使用。不同基因表达水平检测采用 ABI7500 qRT-PCR 仪（ABI，Carlsbad，CA，美国），以 18S rRNA（GenBank：KT343378）作为内参基因。反应体系 10 μL：SYBR *Premix Ex Taq*™（2 ×）5 μL，正反向引物（10 μmol/L）各 0.5 μL，cDNA 模板 1 μL，DEPC 处理过的灭活 ddH_2O 4 μL。扩增条件：95℃ 预变性 3 min；95℃ 变性 15 s，60℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 30 s，共计 40 个循环，溶解曲线分析后除去非特异性样品数据，每样品次 3 个技术重复，实验重复 3 次。利用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 方法分析基因转录的差异，$\triangle C_t = C_{t目的基因} - C_{t内参基因}$；$\triangle\triangle C_t = \triangle C_{t处理} - \triangle C_{t参考基因}$（Livak and Schmittgen，2001）。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列（5′–3′） Primer sequences	用途 Purpose	目的片段大小（bp） Size of target fragment
TH F	GTCCCGCATCAACTTGCTG	qRT-PCR 中目的基因扩增 Amplification of target gene in qRT-PCR	212
TH R	CCCTGTAGTCCTTGTCAGC		
EcR F	AATTGCCCGTCAGTACGA		123
EcR R	TGAGCTTCTCATTGAGGA		
18S F	GCATCTTTCAAATGTCTGC	qRT-PCR 中内参基因扩增 Amplification of the reference gene in qRT-PCR	230
18S R	TACTCATTCCGATTACGAG		
EcR RNAi F	CGCTGGTATAACAACGGAGGA	双链 RNA 合成 dsRNA synthesis	348
EcR RNAi R	AGCTGGAGACAACTCCTCACG		
GFP RNAi F	TGGTCCCAATTCTCGTGGAAC		468
GFP RNAi R	CTTGAAGTTGACCTTGATGCC		
EcR T7 RNAi F	GCGTAATACGACTCACTATAGGCGCTGGTATAACAACGGAGGA		395
EcR T7 RNAi R	GCGTAATACGACTCACTATAGGAGCTGGAGACAACTCCTCACG		
GFP T7 RNAi F	GCGTAATACGACTCACTATAGGTGGTCCCAATTCTCGTGGAAC		512
GFP T7 RNAi R	GCGTAATACGACTCACTATAGGCTTGAAGTTGACCTTGATGCC		

1.4　双链 RNA 的合成

以 1.3 节中备用的棉铃虫 cDNA 为模板，根据棉铃虫蜕皮激素受体基因 *EcR*（GenBank 登录号：KY328717）序列设计引物（表 1），PCR 扩增棉铃虫待干扰 *EcR* 基因 cDNA 片段，切胶回收后将待干扰基因 *EcR* cDNA 片段与 pMD18-T 载体连接，对照采用实验室保存的含有 GFP 基因片段序列的表达载体 pNUS-*GFP*cH（质粒中 *GFP* 的 GenBank 登录号为 AY056838），引物序列见表 1。通过蓝白斑筛选，经测序验证正确后备用。分别以含有 *EcR* 与 *GFP* 目的片段的 pMD18-T 质粒为模板，分别以含有 T7 启动子序列的 *EcR* 与 *GFP* 引物（表 1）进行 PCR 扩增，连接 pMD-18T 载体，通过蓝白斑筛选，经测序验证正确后作为模板，以含有 T7 启动子的引物进行 PCR 扩增，电泳检测，并纯化 PCR 产物，然后用 MEGAscript RNAi Kit（ABI 公司）进行体外转录，合成的 *EcR* 与 *GFP* dsRNA 片段 −20℃保存以备 RNAi 实验用。

1.5　20E 对 *TH* 基因转录水平的影响

参照 Chen 等（2017）方法并略作调整，首先用 DMSO 稀释 20E 至 10 mg/mL（20 mmol/L），用磷酸盐缓冲液 PBS（pH 7.4）稀释至 100 ng/μL，将毛细纤维管拉长后固定在微量注射器上，取棉铃虫 5 龄 24 h 幼虫，注射腹足，每头注射 400 ng，对照注射等量稀释后的 DMSO（Chen *et al.*, 2017）。分别在注射后 0.5，1 和 3 h 取样，各处理重复 3 次。以各时间取样样品为材料，Trizol 提取总 RNA 反转录，以各样品 cDNA 为模板，以合成的 *TH* qRT-PCR 引物进行 qRT-PCR 检测，PCR 反应体系和程序同 1.3 节，分析 *TH* 基因的转录水平。

1.6　蜕皮激素受体基因（*EcR*）dsRNA 干涉后 20E 处理对 *TH* 基因表达量的影响

取出 1.4 节中合成的双链 RNA，将 20 μg *EcR* dsRNA 注射入棉铃虫 5 龄 24 h 幼虫腹足，以注射等量 *GFP* dsRNA 为对照。分别于注射后 24，48 和 72 h 取样，各处理重复 4 次，选取其中 3 次进行统计分析。提取总 RNA，反转录合成 cDNA，以该反转录 cDNA 为模板，根据棉铃虫 *EcR*（GenBank 登录号：KY328717）序列设计 qRT-PCR 引物进行荧光定量检测（表 1），分析 *EcR* 基因 RNAi 干涉效果，PCR 反应体系和程序同 1.3 节。

同上处理，棉铃虫 5 龄 24 h 幼虫注射 *EcR* dsRNA，间隔 24 h 后再次注射 20E 400 ng 分别处理 0.5，1 和 2 h，各处理重复 4 次，选取其中 3 次进行统计分析，提取总 RNA 反转录合成 cDNA，以合成的 *TH* qRT-PCR 引物进行 qRT-PCR 检测（表 1），PCR 反应体系和程序同 1.3 节，分析 *EcR* 基因 RNAi 后 20E 对 *TH* 表达量的影响。

1.7　鞣化激素及环腺苷酸（cAMP）处理对棉铃虫幼虫脂肪体 TH 活性的影响

取棉铃虫 5 龄 48 h 幼虫脂肪体组织，PBS 清洗后放入组织培养液（Grace's Insect Medium，Gibco 公司）培养，用鞣化激素 α 与 β 亚基二聚体重组蛋白（30 μg/mg 组织）及环腺苷酸 cAMP（200 ng/mg 组织）各处理（3 次重复），对照不加鞣化激素（CK，0 min），处理后 10，30 和 60 min 取脂肪体样品，用液氮迅速冷冻终止反应，随后加入 200 μL 蛋白裂解液，研磨样品取上清备用。用酪氨酸羟化酶定量检测试剂盒定量测定 TH 酶活力（U）。酶活性计算公式：酶活性 =［（样品读数 − 背景读数）（样品稀释倍数 × 0.25（体系容量：mL）］/［0.01（样品容量：mL）× 3.7（毫摩尔吸光系数）× 30（反应时间：min）］，以 μmol 多巴/min · mg pro 为单位表示。

1.8　数据统计与分析

实验数据结果参照 Yue 等（2016）和 Du 等（2017）统计学分析方法，即取 3 次生物学实验重复，误差计算 3 次重复的标准差；数据处理首先采用 DPS 软件（DPS7.05 单机版）进行分析处理（Yue *et al.*, 2016；Du *et al.*, 2017），不同时间点两两间的差异显著采用独立样本 *t* 检验，不同数据间差异显著采用单因素方程分析。

2　结果

2.1　棉铃虫 *TH* 基因序列及系统进化位置

利用棉铃虫转录组 unigene 序列建立核苷酸本地 BLAST 数据库，以家蚕酪氨酸羟化酶氨基酸序列为诱饵蛋白，调取棉铃虫同源基因 cDNA 序列。通过与棉铃虫基因组核苷酸序列比对，获得棉铃虫酪氨酸羟化酶基因 cDNA 全长序列 2 270 bp，其中开放阅读框 1 686 bp，该基因共编码 561 个氨基酸残基，预测分子量为 63.303 kD。将该基因核苷酸序列提交 GenBank，获得该序列登录号：MF440319。

氨基酸序列比对分析结果表明，棉铃虫 TH 与其他昆虫中该基因所编码氨基酸序列一致性在 70% 以上（图 1），其中与甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* TH 的氨基酸序列一致性最高，达 97.86%；与鳞翅目其他昆虫如粘虫 *Mythimna separata*、家蚕 *Bombyx*

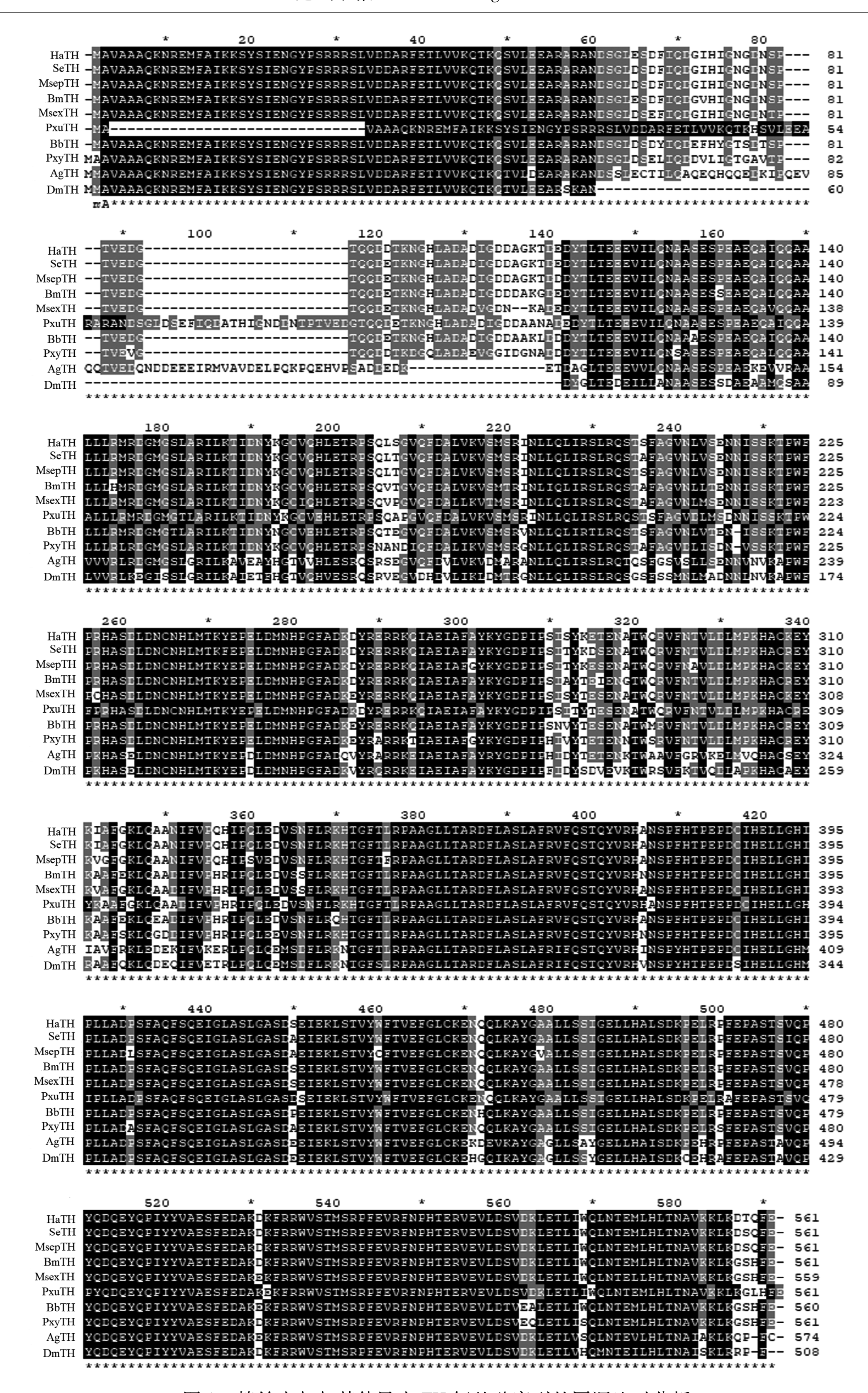


图 1 棉铃虫与与其他昆虫 TH 氨基酸序列的同源比对分析

Fig. 1 Multiple sequence alignment of TH from *Helicoverpa armigera* with the homologs in other insects

蛋白来源及 GenBank 登录号 Origin species of proteins and their GenBank accession numbers: SeTH: 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (JF795468.1); MsepTH: 粘虫 *Mythimna separata* (AB274834.1); BmTH: 家蚕 *Bombyx mori* (NM_001145322.1); PxuTH: 柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* (AB178006.1); MsexTH: 烟草天蛾 *Manduca sexta* (EF592177.1); BbTH: 桦尺蠖 *Biston betularia* (GU953229.1); PxyTH: 小菜蛾 *Plutella xylostella* (HM215247.1); AgTH: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (XM_316061.3); DmTH: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (X76209.1); HaTH: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (MF4400319). 图 2 同 The same for Fig. 2.

mori、柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*、烟草天蛾 *Manduca sexta*、桦尺蠖 *Biston betularia*、小菜蛾 *Plutella xylostella* TH 的氨基酸序列一致性也分别为 96.79%，94.47%，94.47%，94.30%，91.98% 和 88.08%；与双翅目昆虫 TH 的一致性较与鳞翅目昆虫 TH 的一致性略低，其中与冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 TH 氨基酸序列一致性分别为 72.35% 和 70.11%。

将 TH 进行聚类分析，并建系统进化树（图 2）。结果显示，棉铃虫 TH 与同属夜蛾科的甜菜夜蛾和粘虫亲缘关系较近，与同属双翅目的冈比亚按蚊和黑腹果蝇亲缘关系较远，这与 TH 氨基的酸序列同源联配分析结果（图 1）相一致。

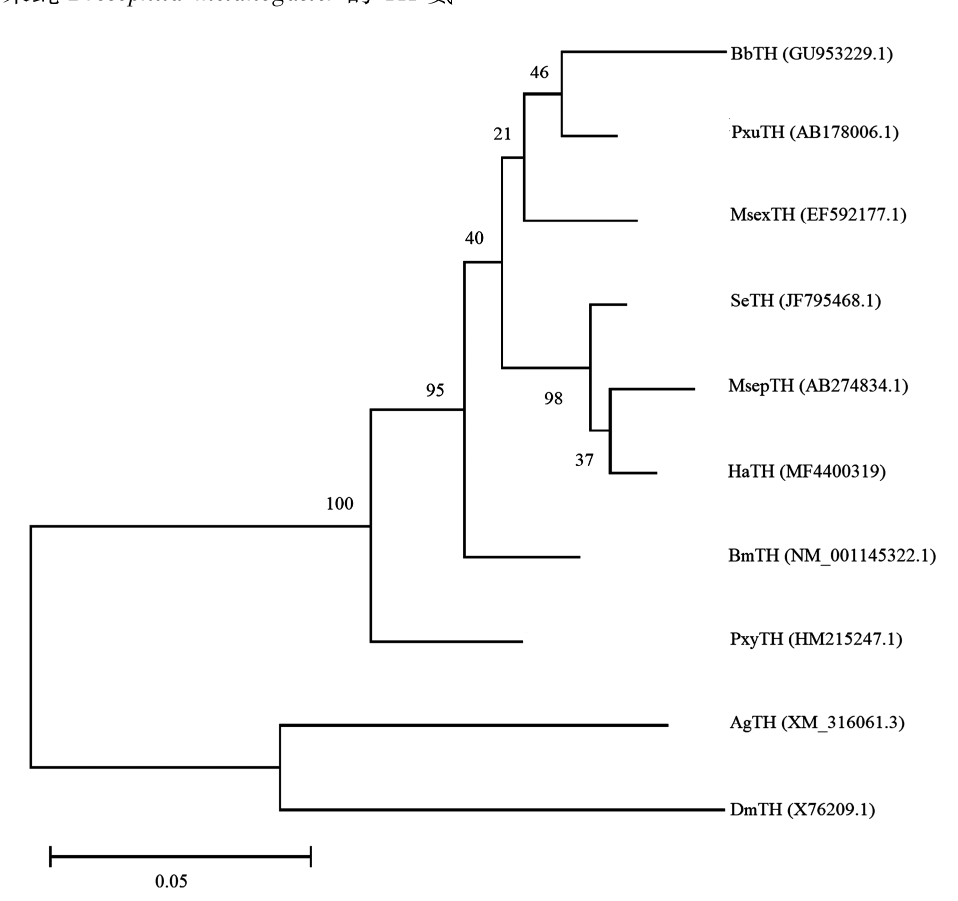


图 2　最大似然法构建的基于棉铃虫和其他昆虫 TH 氨基酸序列系统进化树（MEGA ver. 7.0.14，1 000 次重复）

Fig. 2　Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of TH from *Helicoverpa armigera* and other insect species by maximum likelihood method (MEGA ver. 7.0.14, 1 000 replicates)

2.2　棉铃虫 *TH* 基因在不同发育期表达模式

qRT-PCR 检测结果表明（图 3），*TH* 基因在卵期第 3 天、2 龄幼虫第 1 天、3－5 龄蜕皮期、预蛹期和成虫羽化第 1 天表达量相对较高。

2.3　20E 处理对 *TH* 转录水平的影响

qRT-PCR 检测发现，幼虫在注射 20E（400 ng/头）后，随着时间的变化，*TH* mRNA 表达量在 0.5 h 最高，随后在 1 h 后又迅速下降（图 4）。同时，与对照比较，幼虫 *TH* mRNA 表达量在 0.5 h 较对照（注射 DMSO）显著提高（$P=0.0001$），随后在 1 h（$P=0.0849$）和 3 h（$P=0.1012$）后与对照无显著差异（$P>0.05$）。

2.4　RNA 干扰 *EcR* 后对棉铃虫 *TH* 表达量的影响

qRT-PCR 检测结果表明，随着时间的推移，对照和处理幼虫 *EcR* mRNA 表达量均呈下降趋势。同时与对照比较，幼虫 *EcR* mRNA 表达量呈显著下降趋势（$P=0.0001$），该转录水平一直持续到 72 h（图 5：A），表明 *EcR* 干涉效果很好。在此前提条件下，即将体内内源 *EcR* 干涉调低后再利用外源 20E 注射虫体，检测 *TH* 转录水平变化。当 *EcR* 被成功干涉后（即注射 *EcR* dsRNA 后 24 h，对照注射 *GFP* dsRNA），再用 20E 处理（400 ng/头），结果表明，0.5～1 h 内对照组中 *TH* 转录水平显著高于处理处理组中的（$P=0.0001$），2 h 时仍有差异（$P=0.0436$）

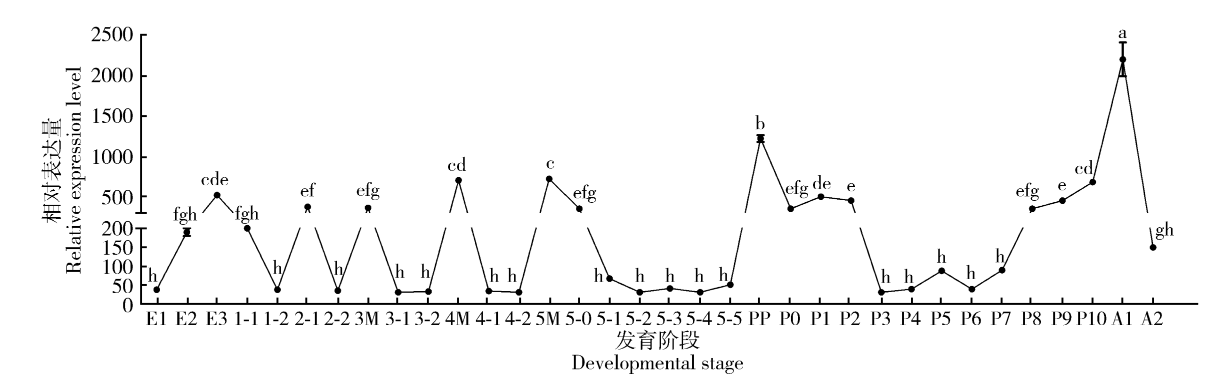


图 3 TH 基因在棉铃虫不同发育阶段的表达水平

Fig. 3 Developmental expression profiles of *TH* in *Helicoverpa armigera*

E1 –3：分别为 1 –3 日龄卵 1 –3-day-old egg, respectively; 1-1 –2：分别为 1 龄幼虫第 1 –2 天 Day 1 –2 of the 1st instar larva, respectively; 2-1 –2：分别为 2 龄幼虫第 1 –2 天 Day 1 –2 of the 2nd instar larva, respectively; 3-1 –2：分别为 3 龄幼虫第 1 –2 天 Day 1 –2 of the 3rd instar larva, respectively; 4-1 –2：分别为 4 龄幼虫第 1 –2 天 Day 1 –2 of the 4th instar larva, respectively; 5-1 –5：分别为 5 龄幼虫第 1 –5 天 Day 1 –5 of the 5th instar larva, respectively; M：蜕皮期 Molting stage; PP：预蛹期 Pre-pupal stage; P0 –10：化蛹后 0 –10 天 0 –10 d after pupation; A1 –2：分别为 1 和 2 日龄成虫 1 –2-day-old adult, respectively. 图中数据为平均值 ± 标准误，不同小写字母代表基因表达差异显著（$P<0.05$；ANOVA 和 Tukey 氏检验）。Data in the figure are mean ± *SE*. Statistically significant differences are denoted by different small letters (ANOVA and Tukey's test, $P<0.05$).

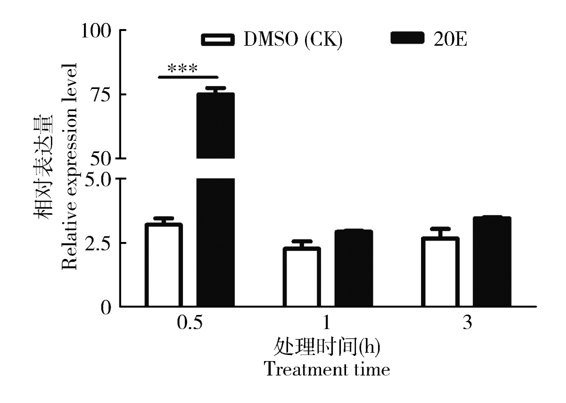


图 4 20E 处理（400 ng/头）对棉铃虫 TH 基因相对表达量的影响

Fig. 4 Effect of 20E (400 ng/individual) on *TH* transcript level of *Helicoverpa armigera*

图中数据为平均值 ± 标准差；三星号示同一时间点处理与对照（DMSO）之间差异显著（$P<0.001$，*t* 检验）。Data in the figure are expressed as mean ± *SD*. The triple asterisk indicates significant difference between the treatment and the control (DMSO) at the same time point ($P<0.001$, *t*-test).

（图 5：B），表明在内源 *EcR* 被干扰的幼虫，即使注射 20E，*TH* 基因转录水平仍然处于较低表达水平。

2.5 蜕化激素/cAMP 对棉铃虫幼虫脂肪体中 TH 酶活性的影响

从图 6（A）TH 酶活性检测结果可以看出，蜕化激素重组蛋白（30 μg/mg 组织）在体外处理脂肪体后，10 min 内即激活 TH 酶，活力一直持续至 1 h（$P=0.006$），表明脂肪体在体外培养条件下，蜕化激素在短时间内即提高 TH 合成多巴胺的酶活力。

同样实验条件下，与蜕化激素具有类似趋势，cAMP 处理（200 ng/mg 组织）也能在较短时间内显著提高 TH 活性（图 6：B）。

3 讨论

我们以重要农业害虫棉铃虫为研究对象，根据幼虫脂肪体转录组 unigene 建立核苷酸本地数据库，利用生物信息学技术得到并验证了 *TH* 核苷酸序列。通过氨基酸序列相似性分析，发现所获得棉铃虫 TH 与其他昆虫 TH 有很高的序列一致性。进一步多重联配和进化树分析，发现该基因与其他昆虫 *TH* 有很高的序列保守性，能够与其他昆虫 *TH* 聚在一起，这些结果表明，我们在棉铃虫中所获得的基因确实为酪氨酸羟化酶基因。

利用 qRT-PCR 技术，我们研究了棉铃虫 *TH* 基因在不同发育期的表达模式，发现该基因在卵期第 3 天、2 龄幼虫第 1 天、3 –5 龄蜕皮期、预蛹期和成虫羽化第 1 天相对表达量较高（图 3），其羽化期表达模式与其在家蚕中表达水平相一致（韩宇等，2010）。这些结果表明，棉铃虫 *TH* 基因在变态蜕皮期高丰度表达。昆虫蜕皮过程包括表皮细胞的一系列活动，分泌新的表皮因子，形成新的内表皮，产生蜕皮液，消化旧表皮等过程，其中 20E 在此过程中是主要调控者。研究表明，20E 通过其核受体 EcR-USP 复合体调控了下游信号相关基因的表达，从而启动了蜕皮变态的进行（Liu *et al.*, 2015）。

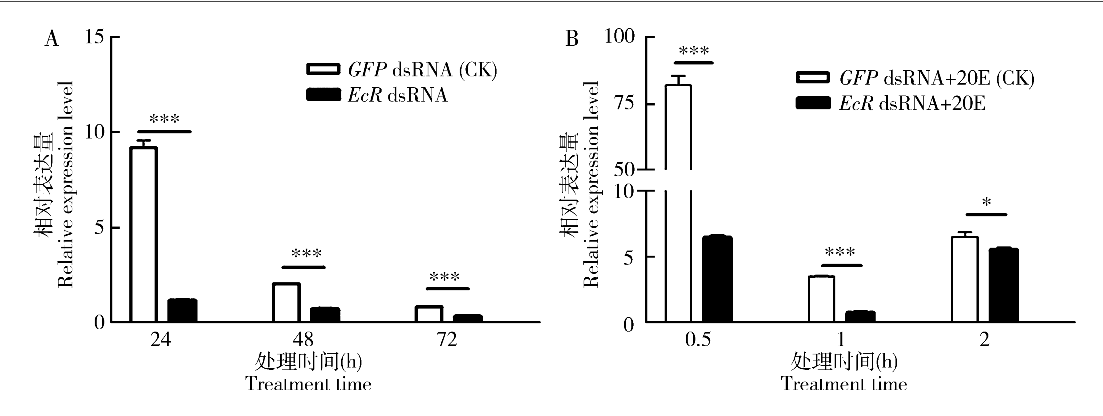


图 5　*EcR* 基因 RNAi 后 20E 对棉铃虫 *TH* 表达量的影响

Fig. 5　Effect of 20E on the expression level of *TH* in *Helicoverpa armigera* after treatment with *EcR* dsRNA

A：注射 *EcR* dsRNA 后不同时间 *EcR* 基因的相对表达量 Relative expression level of *EcR* after injection of *EcR* dsRNA for different time；B：*EcR* 基因 RNAi 后注射 20E（400 ng/头）Injection of 20E（400 ng/individual）after treatment with *EcR* dsRNA. 图中数据为平均值 ± 标准差；星号和三星号分别表示同一时间点处理与对照间差异显著（$P < 0.05$）和极显著（$P < 0.001$）（*t* 检验）。Data in the figure are expressed as mean ± *SD*. The asterisk and triple asterisk indicate significant difference（$P < 0.05$）and extremely significant difference（$P < 0.001$），respectively，between the treatment and the control at the same time point（*t*-test）.

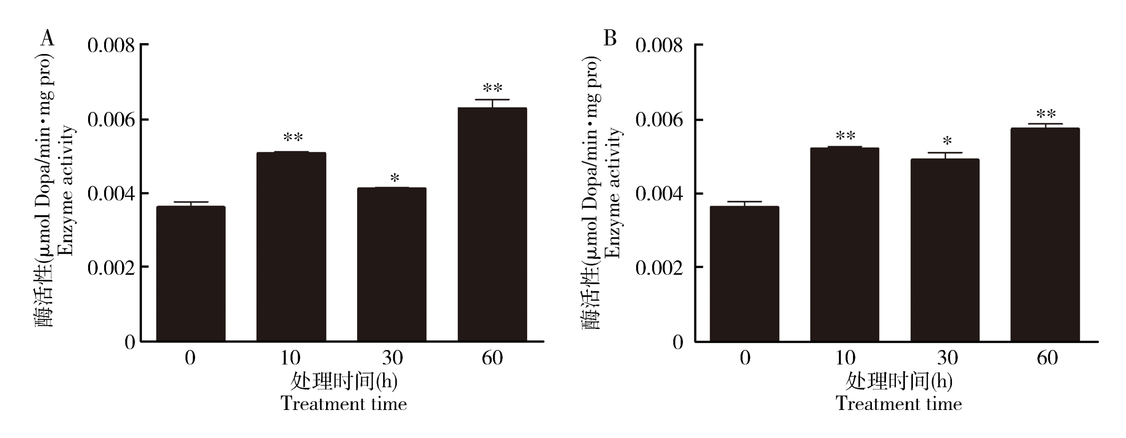


图 6　鞣化激素（30 μg/mg 组织）（A）与 cAMP（200 ng/mg 组织）（B）处理对棉铃虫 TH 酶活性的影响

Fig. 6　Effects of bursicon（30 μg/mg tissue）（A）and cAMP（200 ng/mg tissue）（B）on the TH activity of *Helicoverpa armigera*

图中数据为平均值 ± 标准差；柱上星号和双星号分别表示与对照（0 min）相比差异显著（$P < 0.05$）和极显著（$P < 0.01$）（*t* 检验）。Data in the figure are expressed as mean ± *SD*. The asterisk and double asterisk above bars indicate significant difference（$P < 0.05$）and extremely significant difference（$P < 0.01$），respectively，from the control（0 min）（*t*-test）.

棉铃虫 *TH* 基因在蜕皮过程中高丰度的表达，正是我们研究 TH 与 20E 之间的关系所在。正如本研究结果所示，与处理相比，对照组 20E 处理显著促进 *TH* 的表达，进一步利用 RNAi 降低蜕皮激素受体基因 *EcR* 的表达后，也同时降低了 *TH* mRNA 的表达。这些结果充分说明棉铃虫 *TH* 在转录水平上的表达是受 20E 调控的。昆虫蜕皮后新形成的表皮是柔软的，尚未黑化及硬化，在这个时期外源的病原微生物容易侵入，而且尚未黑化和硬化的表皮也容易导致体内水分的丧失。因此，昆虫为了生存，在蜕皮后其表皮必须尽快黑化和硬化（An *et al.*，2012）。而酪氨酸羟化酶是黑化和硬化过程中的关键酶，所以在这一点上 TH 响应 20E 信号、促进表皮的黑化和硬化也是在情理之中的。

20E 是变态发育的主要激素，但昆虫变态发育是由众多激素共同参与完成的（Clark *et al.*，2004）。其中，在昆虫蜕去旧表皮、形成新表皮，乃至羽化后继续完成生命最后旅程中，除了 20E 外，鞣化激素也参与其中（Davis *et al.*，2007）。鞣化激素保证了昆虫在羽化后数小时内表皮的鞣化及成虫翅的有效伸展，同时激发了体内高效的免疫活力、避免虫体在蜕皮期遭受外界微生物等不良因素的侵扰（An *et al.*，2012）。昆虫在完成表皮的鞣化及翅的扩张等一系列生理生化反应中，TH 起着相当重要的作用，活化的 TH 将酪氨酸转变为多巴，最终保证了表皮的鞣化及翅的延展（Song，2012）。一般认为 20E 滴

度的变化是引起蜕皮的早期信号，而鞣化激素滴度的变化是变态发育的最后一个激素因子，对于调控表皮的黑化过程的关键酶酪氨酸羟化酶而言，其与鞣化激素之间具体的作用细节仍然不清楚。所以本研究也进一步分析了鞣化激素对 TH 的调控作用。鞣化激素作为昆虫重要的神经肽，其主要功能是调控新表皮的骨化及翅的扩张。研究发现其作用模式主要为鞣化激素与其 G 蛋白偶联受体结合后激活 cAMP/PKA 信号，PKA 进一步激活下游相关的信号分子，从而开启了昆虫表皮的黑化和翅的扩张等生物过程。我们也对表皮的黑化过程的关键酶 TH 与鞣化激素之间的联系进行了验证，结果表明鞣化激素处理可以明显增强 TH 的活性；进一步直接利用 cAMP 处理也能在极短时间内提高酪氨酸羟化酶的活性。这些结果表明了鞣化激素/受体/cAMP/PKA 信号通过增强 TH 的活性，从而激活了儿茶酚胺类生物途径（Davis *et al*., 2007；Arakane *et al*., 2016），进而实现了对表皮黑化的调控作用。我们在利用棉铃虫为模式昆虫的研究中也发现，鞣化激素短时间处理（10 min）即能提高 TH 的活性。这也表明，鞣化激素对 TH 活性的调控主要发生在蛋白水平，该结果也与果蝇中的研究相一致（Davis *et al*., 2007）。在果蝇中，鞣化激素激活的 PKA 通过磷酸化激活了 TH 活性从而调控了表皮的黑化（Davis *et al*., 2007）。这些研究也说明了鞣化激素功能的保守性。本研究同时分析了 20E 和鞣化激素对 TH 在不同表达水平的调控作用，说明了基因表达的调控是受众多因素来调控。但对 TH 详细调控的分子机制仍然需要进一步研究。

参考文献（References）

An S, Dong S, Wang Q, Li S, Gilbert LI, Stanley D, Song Q, 2012. Insect neuropeptide bursicon homodimers induce innate immune and stress genes during molting by activating the NF-κB transcription factor Relish. *PLoS ONE*, 7(3): e34510.

An S, Wang S, Gilbert LI, Beerntsen B, Ellersieck M, Song Q, 2008. Global identification of bursicon-regulated genes in *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics*, 9(1): 424–437.

Andersen SO, 2012. Cuticular sclerotization and tanning. In: Gilbert LI ed. Insect Molecular Biology and Biochemistry. Academic Press, Oxford. 167–192.

Arakane Y, Mi YN, Asano T, Kramer KJ, 2016. Tyrosine metabolism for insect cuticle pigmentation and sclerotization. In: Cohen E, Moussian B eds. Extracellular Composite Matrices in Arthropods. Springer International Publishing, Cham, Switzerland. 165–205.

Baker J, Truman JW, 2002. Mutations in the *Drosophila* glycoprotein hormone receptor, rickets, eliminate neuropeptide-induced tanning and selectively block a stereotyped behavioral program. *J. Exp. Biol*., 205(17): 2555–2565.

Chen CH, Pan J, Di YQ, Liu W, Hou L, Wang JX, Zhao XF, 2017. Protein kinase C delta phosphorylates ecdysone receptor B1 to promote gene expression and apoptosis under 20-hydroxyecdysone regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114(34): E7121–E7130.

Clark AC, del Campo ML, Ewer J, 2004. Neuroendocrine control of larval ecdysis behavior in *Drosophila*: complex regulation by partially redundant neuropeptides. *J. Neurosci*., 24(17): 4283–4292.

Curtis AT, Hori M, Green JM, Wolfgang WJ, Hiruma K, Riddiford LM, 1984. Ecdysteroid regulation of the onset of cuticular melanization in allatectomized and *Black* mutant *Manduca sexta* larvae. *J. Insect Physiol*., 30(8): 597–606.

Davis MM, O'Keefe SL, Primrose DA, Hodgetts RB, 2007. A neuropeptide hormone cascade controls the precise onset of post-eclosion cuticular tanning in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 134(24): 4395–4404.

Du M, Zhao W, Jurenka R, Liu X, Yin X, Song Q, An S, 2017. Transcriptome analysis of *Helicoverpa armigera* male hairpencils: alcohol biosynthesis and requirement for mating success. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 87: 154–164.

Gervasi NM, Scott SS, Aschrafi A, Gale J, Vohra SN, MacGibeny MA, Kar AN, Gioio AE, Kaplan BB, 2016. The local expression and trafficking of tyrosine hydroxylase mRNA in the axons of sympathetic neurons. *RNA*, 22(6): 883–895.

Gorman MJ, Arakane Y, 2010. Tyrosine hydroxylase is required for cuticle sclerotization and pigmentation in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 40(3): 267–273.

Han Y, Liu C, Wei LW, Ren JB, Liu PY, Xia QY, 2010. Expression profile and function of tyrosine hydroxylase gene *Bmth* in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin*., 53(9): 949–956. [韩宇，刘春，魏丽婉，任静波，刘品彦，夏庆友，2010. 家蚕酪氨酸羟化酶基因 *Bmth* 的表达及功能. 昆虫学报，53(9): 949–956]

Kramer KJ, Morgan TD, Hopkins TL, Christensen A, Schaefer J, 1991. Insect cuticle tanning: enzymes and cross-link structure. In: Hedin PA ed. Naturally Occurring Pest Bioregulators. ACS Symposium Series No. 449. American Chemical Society, Washington DC. 87–105.

Liu X, Dai F, Guo E, Li K, Ma L, Tian L, Cao Y, Zhang G, Palli SR, Li S, 2015. 20-Hydroxyecdysone (20E) primary response gene *E*93 modulates 20E signaling to promote *Bombyx* larval-pupal metamorphosis. *J. Biol. Chem*., 290(45): 27370–27383.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.

Lu YH, Jiang YY, Liu J, Zeng J, Yang XM, Wu KM, 2018. Adjustment of cropping structure increases the risk of cotton bollworm outbreaks in China. *Chin. J. Appl. Entomol*., 55(1): 19–24. [陆宴辉，姜玉英，刘杰，曾娟，杨现明，吴孔明，

2018. 种植业结构调整增加棉铃虫的灾变风险. 应用昆虫学报, 55(1): 19–24]

Luo CW, Dewey EM, Sudo S, Ewer J, Hsu SY, Honegger HW, Hsueh AJW, 2005. Bursicon, the insect cuticle-hardening hormone, is a heterodimeric cystine knot protein that activates G protein-coupled receptor LGR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(8): 2820–2825.

Mendive FM, Van Loy TV, Claeysen S, Poels J, Williamson M, Hauser F, Grimmelikhuijzen CJP, Vassart G, Vanden Broeck J, 2005. *Drosophila* molting neurohormone bursicon is a heterodimer and the natural agonist of the orphan receptor DLGR2. *FEBS Lett.*, 579(10): 2171–2176.

Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S, 1964. Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 239(9): 2910–2917.

Reynolds SE, Taghert P, Truman JW, 1979. Eclosion hormone and bursicon titres and the onset of hormonal responsiveness during the last day of adult development in *Manduca sexta* (L.). *J. Exp. Biol.*, 78: 77–86.

Song Q, 2012. Bursicon, a neuropeptide hormone that controls cuticle tanning and wing expansion. In: Gilbert LI ed. Insect Endocrinology. Academic Press, Oxford. 93–105.

Wright TRF, 1987. The genetic and molecular organization of the dense cluster of functionally related, vital genes in the DOPA decarboxylase region of the *Drosophila melanogaster* genome. In: Hennig W ed. Results and Problems in Cell Differentiation, Vol. 14. Structure and Function of Eukaryotic Chromosomes. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 95–120.

Yue Z, Liu X, Zhou Z, Hou G, Hua J, Zhao Z, 2016. Development of a novel-type transgenic cotton plant for control of cotton bollworm. *Plant Biotechnol. J.*, 14(8): 1747–1755.

（责任编辑：马丽萍）